

**EFFECTO DE LA CONSERVACION DE LAS MUESTRAS SOBRE EL
COMPORTAMIENTO SEROLOGICO DE DIFERENTES ESTIRPES DE
*BRADYRHIZOBIUM (CHAMAECYTISUS)***

M. Santamaría(1), J. Corzo(1), M.A. León-Barrios(2) y A.M. Gutiérrez-Navarro(2)

Departamentos de Bioquímica y Biología Molecular(1) y de Microbiología y Biología Celular(2).
Universidad de La Laguna. La Laguna 38206 Tenerife

SUMMARY

This work deals with the variable response against ELISA test by some isolates from *Bradyrhizobium (Chamaecytisus)* infective on leguminous endemic to Canary Islands. This variability was explained as a consequence of the previous history and manipulation of the samples, mainly temperature for its preservation and freezing-thawing cycles. It is concluded that the serological relationships between species or strains must be studied using freshly prepared samples.

RESUMEN

En este trabajo se describe la variabilidad de la respuesta en el análisis por ELISA de una colección de aislados de *Bradyrhizobium (Chamaecytisus)* infectivos en leguminosas endémicas de las Islas Canarias. Al estudiar las causas de esta variabilidad, se encontró que la conservación e historia de las muestras previa a la realización del análisis afecta su reacción con los antisueros, siendo especialmente significativos la temperatura de conservación de las preparaciones antigénicas, así como el sometimiento de la mismas a ciclos sucesivos de congelación y descongelación. Se concluye que estos trabajos han de ser realizados utilizando exclusivamente muestras bacterianas recién cultivadas.

KEY WORDS: *Bradyrhizobium*, ELISA, antigenic relationships, Canary Island Endemic legumes

PALABRAS CLAVE: *Bradyrhizobium*, ELISA, relaciones antigénicas, leguminosas endémicas de las Islas Canarias

1. INTRODUCCION

Las bacterias que forman nódulos fijadores de nitrógeno con las raíces de las leguminosas se encuadran en los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, pertenecientes a la familia Rhizobiaceae -para una revisión, ver [3]-. La mayor parte del trabajo realizado con estas bacterias se ha centrado en las estirpes infectivas en las leguminosas más interesantes para la nutrición humana o animal, y se conoce muy poco sobre los microsimbiontes de otras leguminosas menos utilizadas en la agricultura convencional. Por ello y a fin de lograr un conocimiento lo más exacto y completo posible de ambos géneros, existe un interés creciente en el aislamiento de bacterias de nódulos de estas otras leguminosas. El estudio de las estirpes aisladas requiere su encuadre taxonómico, lo que implica relacionarlas con las especies o estirpes ya conocidas de estas bacterias. Las técnicas serológicas constituyen métodos muy específicos para la identificación de microorganismos y, por ello, han sido ampliamente utilizadas no sólo para la identificación sino también para el establecimiento de relaciones entre diferentes especies y estirpes de rizobiáceas [2, 5, 8]. Entre las técnicas serológicas destaca por su sensibilidad, rapidez y facilidad de realización el denominado ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Analysis), que fue empleado por vez primera para la identificación de estirpes de *Rhizobium* por BERGER y col. [1]. Estos autores encontraron que la congelación de los nódulos radicales o de las suspensiones de bacterias, previa al análisis, no alteraba los resultados del test ELISA. Sin embargo, en un estudio serológico de bradirrizobios aislados en nuestro laboratorio de muestras procedentes de diversas localidades de las Islas Canarias que habían sido congeladas, se detectaron resultados erráticos y algunas estirpes mostraron una homología aparente muy variable respecto a las utilizadas como referencia.

El objetivo de este trabajo fue el análisis de las causas de la mencionada variabilidad, especialmente en lo referente al tratamiento de las muestras previo a la realización del test ELISA.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Microorganismos y condiciones de cultivo

Las bacterias utilizadas para la obtención de los antisueros fueron las estirpes BGA-1 y BTA-1 de *Bradyrhizobium* sp. (*Chamaecytisus proliferus*), aisladas a partir de nódulos de *Teline stenopetala* y de *Chamaecytisus proliferus* ssp. *proliferus* respectivamente [4].

Con los antisueros obtenidos se estudió la reacción en ELISA con las siguientes estirpes de *Bradyrhizobium* (*Chamaecytisus*): BRE-1, aislada de nódulos de *T. canariensis*, BTA-3, BTA-4, BTA-5, BTA-7 y BTA-8, aisladas de nódulos de *Ch. proliferus* ssp. *proliferus*, y BCO-4, aislada de nódulos de *Adenocarpus foliolosus*. Como control negativo se empleó *Rhizobium meliloti* 1021.

Las bacterias fueron cultivadas en matraces de 500 ml del medio YM [9], disminuyendo la cantidad de manitol (1,0 g/l) para reducir la producción de polisacáridos. Los cultivos se llevaron a cabo en agitación (150 rpm) a 28°C durante 5 días (fase exponencial tardía).

2.2. Preparación de antígenos y producción de antisueros

Las células fueron recogidas por centrifugación; los sedimentos fueron lavados 3 veces en solución salina (NaCl 0,85%), y las bacterias lavadas se conservaron a -80°C hasta su uso.

Para la preparación de los antígenos se siguió el protocolo descrito por Siverio y col. [7], con modificaciones. Las bacterias fueron suspendidas (0,275 g por cada 10 ml) en tampón PBS (g/l: NaCl, 8,0; Na₂HPO₄.12 H₂O, 2,7; NaH₂PO₄.2H₂O, 0,4; pH 7,2). Las preparaciones antigénicas se obtuvieron calentando las suspensiones bacterianas a 100°C durante 2 horas y se conservaron congelados hasta su empleo.

Los antisueros se prepararon inmunizando hembras de conejo de 2 kg de peso, mediante cuatro inyecciones intramusculares semanales de 2 ml de emulsión 1:1 del antígeno con el

coadyuvante incompleto de Freund (Sigma Chemical, Co.). Una semana después de la última inmunización los conejos fueron sangrados mediante incisión en la vena marginal de la oreja. Los antisueros se titularon frente a suspensiones de la estirpe homóloga mediante ELISA y se conservaron a -80°C hasta su uso.

2.3. Realización de los test de ELISA

Se prepararon suspensiones de bacterias en tampón carbonato sódico (1,59 g de Na_2CO_3 y 2,93 g de NaHCO_3 por litro, pH 9,6), ajustando la absorbancia (λ 600 nm) entre 0,7 y 0,8 unidades.

Los tests se efectuaron en placas de poliestireno (Corning) usándose 4 pocillos para cada estirpe, conteniendo cada uno de ellos 200 μl de la suspensión correspondiente. Después de incubarlos durante 16 horas a 4°C en cámara húmeda, se eliminaron las suspensiones y las placas fueron lavadas con tampón de lavado (0,5 ml de Tween 20 por litro de PBS). Los pocillos se llenaron con 250 μl de solución de bloqueo (albúmina bovina al 1% en PBS) y se incubaron a 37°C durante 30 min. Se lavó tres veces cada placa y se añadió a cada pocillo 190 μl del antisuero correspondiente diluído 10.000 veces en PBS y se incubó durante 1 hora a 37°C . Tras lavar las placas se añadió a cada pocillo 190 μl de inmunoglobulina de cabra anti-IgG de conejo conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma Immuno Chemical) diluída 20.000 veces en PBS. Tras una nueva incubación durante 1 hora a 37°C , se lavaron las placas, y se añadieron 200 μl de sustrato soluble para fosfatasa alcalina (pNPP, Sigma), manteniéndose la reacción 40 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Se paró la reacción añadiendo 50 μl de NaOH 3 M a cada pocillo, midiéndose seguidamente la absorbancia a 450 nm. Como control se emplearon cuatro pocillos por placa con tampón carbonato. El porcentaje de homología con la estirpe de referencia se determinó como:

siendo: X la media de la absorbancia de los cuatro pocillos de cada muestra, Y la media de la

$$\% \text{ homología} = \frac{X - Y}{Z - Y} \times 100$$

absorbancia de los cuatro pocillos control y Z la media de la absorbancia de los cuatro pocillos de la estirpe de referencia.

3 RESULTADOS

Un estudio preliminar sobre la variabilidad de los resultados, utilizando como antígeno preparaciones de *Bradyrhizobium (Chamaecytisus)* BGA-1 y su suero homólogo, reveló que cualquier diferencia inferior a ± 10 por ciento de homología, debe ser considerada como no significativa.

La Figura 1 muestra los resultados de los tests ELISA efectuados con el antisuero producido frente a la estirpe BGA-1 y preparaciones antigénicas de las diferentes bacterias, sometidas a distintos ciclos sucesivos de congelación a -80°C y descongelación durante 2 horas. Las estirpes pueden ser agrupadas en dos clases: por un lado, aquéllas (BTA-5, BTA-7, BTA-3 y *R. meliloti*) cuya homología con BGA-1 no experimentó variaciones significativas, y por otro, las estirpes BRE-1, BTA-8, BTA-4 y BCO-4, cuya homología aparente con la estirpe de referencia disminuyó significativamente.

Por el contrario, cuando se utilizó como estirpe de referencia BTA-1 (para lo que se usó el suero obtenido frente a ella), el cambio observado fue un incremento en la homología aparente de las estirpes BRE-1 y BTA-3 congeladas a -80°C . La congelación de las muestras a -20°C se tradujo en un mayor incremento de las señales y en el aumento del número de estirpes que lo experimentó (Tabla I).

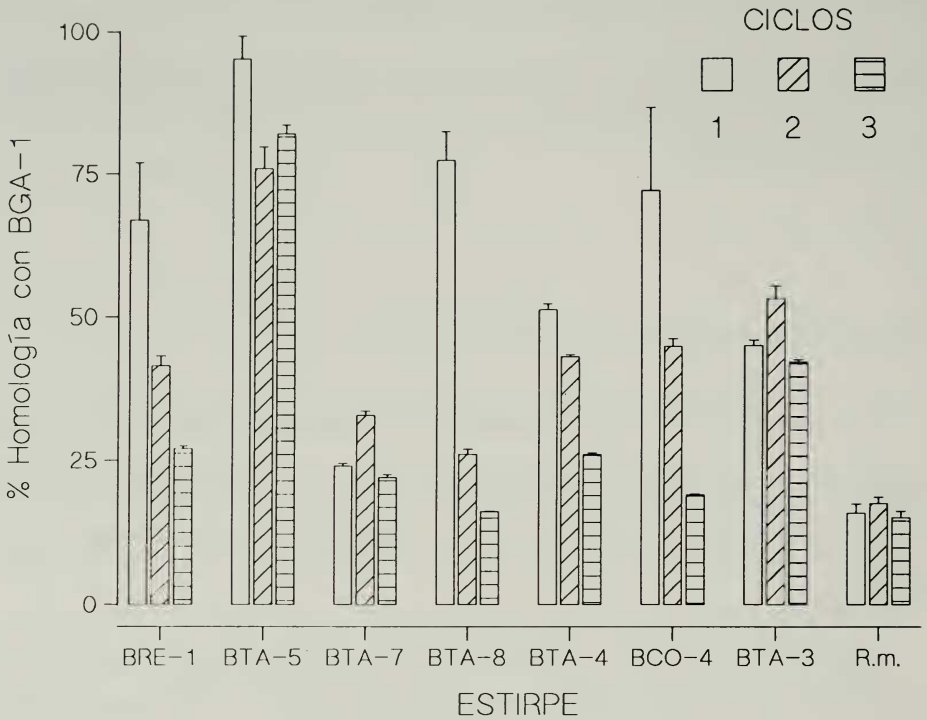


Figura 1. Efecto de los ciclos de descongelación-congelación previos a la preparación de la muestra en la homología con *Bradyrhizobium (Chamaecyctisus)* BGA-1 determinada por ELISA de diferentes aislados de bacterias del género *Bradyrhizobium* y de *Rhizobium meliloti* 1021 (R.m.). Los datos son la media de cuatro determinaciones \pm la desviación estándar.

Dado que cabía la posibilidad de que las suspensiones bacteriana en tampón carbonato fueran más estables que las bacterias congeladas, se efectuó un experimento consistente en preparar suspensiones en dicho tampón y conservarlas durante 0, 1 ó 7 días a 4 y -20°C , para analizarlas por ELISA frente al suero específico para la estirpe BGA-1. Los resultados se muestran en la Figura 2, e indican que las suspensiones bacterianas así conservadas también experimentaron una alteración significativa de su reactividad, tanto en la reacción homóloga como en las heterólogas.

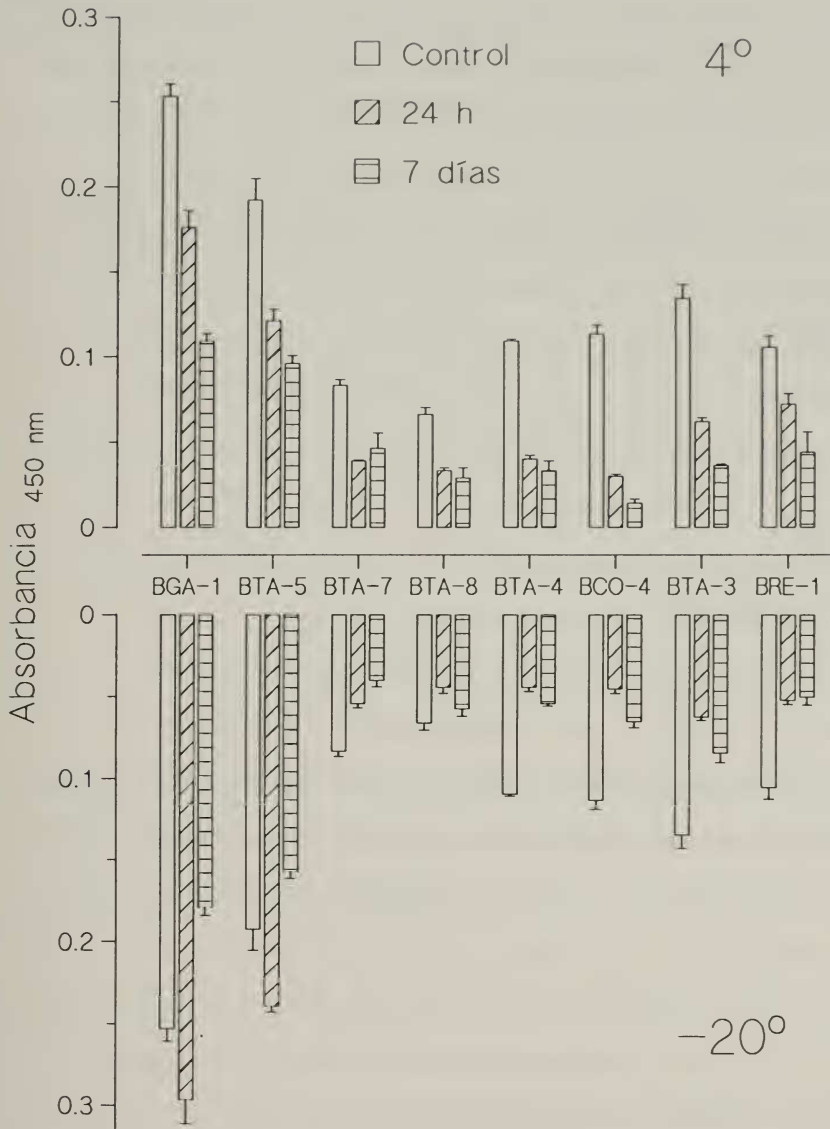


Figura 2. Efecto de la conservación de las suspensiones bacterianas a 4°C y -20°C en tampón bicarbonato sobre la intensidad de la reacción con antisero desarrollado contra *Bradyrhizobium (Chamaecytisus)* BGA-1 medida por ELISA. Para el control se prepararon las placas de ELISA inmediatamente después de preparar las suspensiones de las bacterias. Los datos son la media de cuatro determinaciones ± la desviación estándar.

TABLA I Efecto del almacenamiento y del número de ciclos de congelación-descongelación previos a la preparación de la muestra de diversas estirpes de *Bradyrhizobium* y de *Rhizobium meliloti* 1021 (R.m) sobre el porcentaje de homología medido por ELISA con *Bradyrhizobium (Chamaecytisus)* BTA-1.

	Conservadas a -80°C, 4 meses						R.m
	BRE-1	BTA-3	BTA-4	BTA-5	BTA-7	BCO-4	
1 ciclo	28	17	37	25	28	20	4
3 ciclos	43	33	35	27	25	28	8

	Conservadas a -20°C, 30 meses						R.m
	BRE-1	BTA-3	BTA-4	BTA-5	BTA-7	BCO-4	
2 ciclos	56	33	92	48	93	37	ND
3 ciclos	76	66	96	70	85	45	ND

ND, no determinado

4 DISCUSION

Los resultados mostrados en este trabajo indican que la reacción entre los antígenos bacterianos y los sueros utilizados varía en función de ciclos de congelación-descongelación y también de la temperatura de conservación de las muestras.

Dado que en este trabajo se han utilizado anticuerpos policlonales, no es posible identificar de forma inequívoca la naturaleza de los antígenos responsables de su unión a las bacterias. De los tres tipos principales de antígenos superficiales de las bacterias Gram negativas, los flagelares (H), los capsulares (K) y los lipopolisacáridos de la pared celular (O), cabe descartar a los primeros como importantes en la interacción aquí estudiada, ya que la centrifugación y el tratamiento térmico al que se someten las bacterias para inducir la producción de antisueros debe ser suficiente para eliminarlos [8]. Los antígenos K participan en alguna medida en la reacción, a pesar de que las bacterias fueron lavadas varias veces. En efecto, los dos antisueros empleados

se unieron a los exopolisacáridos purificados de *Bradyrhizobium (Chamaecytisus)* BGA-1, BTA-1 y BRE-1 (datos no mostrados). Por último, los antígenos O son considerados como los principales componentes inmunogénicos de la membrana externa de las bacterias Gram negativas en general y, en concreto, de los rizobios [6]. Ahora bien, no parece justificado atribuir las variaciones en ELISA observadas a cambios estructurales en dichos antígenos, ya que por su naturaleza química deben ser estables frente a los tratamientos relativamente suaves a los que se vieron sometidas las muestras en este estudio. Por ello, cabe suponer que los responsables de estos cambios de reactividad en ELISA sean otros antígenos más lábiles, como por ejemplo las proteínas de la membrana externa, o bien antígenos somáticos solubles que, de hecho, suelen presentar mayor reactividad cruzada entre estirpes o especies que los lipopolisacáridos [8, 5, 6].

Los resultados presentados muestran que ni el almacenamiento de las bacterias aisladas ni el de las suspensiones bacterianas garantizan la consistencia en la determinación de la homología serológica entre las bacterias del género *Bradyrhizobium* estudiadas por nosotros, ya que se obtuvieron resultados muy variables en función de la historia de las muestras. Por ello, este tipo de estudio debe ser realizado con muestras recién cultivadas, ya que su almacenamiento (incluida la congelación) produce artefactos que alteran significativamente los resultados, sin que sea posible predecir la naturaleza o magnitud de esta alteración.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la Dirección General de Universidades e Investigación del Gobierno de Canarias

BIBLIOGRAFIA

- [1] BERGER, J.A., MAY, S.N., BERGER, L.R. y BOHLOOL, B.B. (1979), *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**, 642-646.
- [2] DUDMAN, W.F. (1977), en: *A treatise on dinitrogen fixation, section IV*, John Wiley & Sons, Inc., New York.
- [3] GUTIERREZ-NAVARRO, A.M., LEON-BARRIOS, M.A. y CORZO, J. (1993), *Rev. Acad. Canar. Cienc.*, **V**, 59-115.
- [4] LEON-BARRIOS, M., GUTIERREZ-NAVARRO, A.M., PEREZ-GALDONA, R. y CORZO, J. (1991), *Soil Biol. Biochem.*, **23**, 487-489.
- [5] SADOWSKY, M.J., BOHLOOL, B.B y KEYSER, H.H. (1987), *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 1785-1789.
- [6] SHINDU, S.S., BREWIN, N.J. y KANNENBERG, E.L. (1990), *J. Bacteriol.*, **172**, 1804-1813.
- [7] SIVERIO, F., CAMBRA, M., GORRIS, M.T., CORZO, J. y LOPEZ, M.M. (1993), *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 1805-1812.
- [8] SOMASEGARAN, P. y HOBEN, H.J. (1994), en: *Handbook for Rhizobia*, Springer-Verlag, New York.
- [9] VINCENT, J.M. (1970), en: *A manual for the Practical Study of the Root Nodule de Bacteria*, Blackwell Scientific Publications, Oxford.